

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
Campus Baixada Santista

LUAN CASTRO TONELLI

**INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DOS RECEPTORES
GLUTAMATÉRGICOS DO TIPO AMPA NO
COLÍCULO INFERIOR SOBRE A CATALEPSIA
INDUZIDA PELO HALOPERIDOL EM RATOS.**

Santos
2013

LUAN CASTRO TONELLI

INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DOS RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS DO TIPO AMPA NO COLÍCULO INFERIOR SOBRE A CATALEPSIA INDUZIDA PELO HALOPERIDOL EM RATOS.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de São Paulo como parte dos requisitos curriculares para a obtenção do título de bacharel em Educação Física – Modalidade Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Vagner Thomatieli dos Santos

Co-orientadora: Profa. Dra. Liana Lins Melo

Santos

2013

LUAN CASTRO TONELLI

INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DOS RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS DO TIPO AMPA NO COLÍCULO INFERIOR SOBRE A CATALEPSIA INDUZIDA PELO HALOPERIDOL EM RATOS.

Este exemplar corresponde à redação final do Trabalho de Conclusão de Curso defendido por Luan Castro Tonelli e aprovado pela Banca Examinadora em 16/12/2013.

Prof. Dr. Ronaldo Vagner Thomatieli dos Santos

Orientador

Profa. Dra. Liana Lins Melo

Co-orientadora

Santos

2013

Banca examinadora



Prof. Dr. Ronaldo Vagner Thomatieli dos Santos

Orientador



Profa. Dra. Hanna Karen Morcira Antunes



Prof. Dr. Sionaldo Eduardo Ferreira

Santos

2013

DEDICATÓRIA

É com grande honra e satisfação que dedico este trabalho de pesquisa a Deus, por ser minha base e sustento espiritual, me guiando nos caminhos certos e disciplinados, e aos meus pais, a minha irmã, a minha *sweet girlfriend* Maria, aos meus avós (vó Ione, vô Sérgio e vó Ruth), aos meus tios e tias, principalmente em memória do meu Tio Lúcio e Tia Leonísia, por todos esses que me apoiaram tanto no sentido financeiro quanto no sentido profissional e pessoal. A Todos um muito OBRIGADO por me ajudarem a ser uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

Primordialmente agradeço a Deus por ser o meu alicerce e meu refúgio, por renovar a minha fé a cada dia, evitando que eu fracassasse diante dos meus problemas, e assim contorná-los de maneira que a cada obstáculo tornávasse uma nova oportunidade para aprender.

Agradeço aos meus queridos Pais pela educação que me deram, por me ensinarem a ser honesto, respeitoso, educado e humilde. Que me ensinaram a encher uma grande oportunidade nas pequenas coisas e a dar valor nas coisas mais simples. Obrigado por me ensinarem a amar as pessoas.

Agradeço com muito amor ao meu Tio Leley, que foi e sempre será para mim como um Pai, que nunca me deixou na mão, que sempre esteve disposto a resolver comigo os meus problemas, que sempre me apoiou nas minhas decisões, que sempre acreditou no meu potencial e que sempre me amou de maneira incondicional.

Agradeço com muita saudade e amor ao meu Tio Lúcio e Tia Leonísia, que me deram a oportunidade de um caminho novo em minha vida. Agradeço-os por cada dia que passei no mesmo teto que me concederam e por cada alimento que me deram (*in memory*).

Agradeço aos meus avós, tios e tias e toda família que sempre de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui e sei que sempre estarão torcendo por mim em qualquer lugar que eu esteja.

Agradeço com muito carinho e respeito aos meus orientadores Liana Lins Melo e Ronaldo V.T. dos Santos, que disponibilizaram do seu tempo para me apoiar, me suportar, me disciplinar, me aconselhar e me orientar a fazer a coisa certa. Obrigado por vocês terem extrapolado no bom sentido o limite entre professor e aluno, sendo mais que amigos e conselheiros. Obrigado pela credibilidade e autonomia que me deram e por fim, obrigado principalmente pela confiança que sobre mim foi depositada.

Obrigado a todo corpo docente da Educação Física e do Eixo Biológico, em Especial aos Docentes, Ricardo Luís F. Guerra, Isabel C. Céspedes e Stella Peccin, que sempre me motivaram e que muitas vezes compraram os meus problemas e me ajudaram a superá-los. Obrigado a Educa 04 pelos momentos brilhantes juntos. Saudades eternas.

“O amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não se vangloria, não se ensoberbece, não se porta inconvenientemente, não busca os seus próprios interesses, não se irrita, não suspeita mal; não se regozija com a injustiça, mas se regozija com a verdade; O amor tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta”.

1 Coríntios 13:4-7

“Escolha um trabalho que você ame e não terá que trabalhar nem um dia de sua vida”

Confúcio

RESUMO

O colículo inferior (CI) é uma estrutura mesencefálica primariamente envolvida no processamento da informação auditiva, mas também integra informação sensorial de natureza aversiva. A estimulação elétrica ou química dessa estrutura induz respostas típicas de medo tais como alerta, congelamento e fuga, eliciadas por ameaças ambientais. Evidências científicas sugerem que o substrato neural responsável pelo comportamento defensivo no colículo inferior pode também ser regulado por aminoácidos excitatórios uma vez que a microinjeção de NMDA nessa estrutura induz comportamento defensivo caracterizado por corrida, levantamentos e saltos. Entretanto, a microinjeção de AP7, um antagonista competitivo de receptores NMDA impede a expressão desses comportamentos. Tem sido demonstrado que a estimulação do substrato neural do medo no colículo inferior causa um aumento significativo nos níveis extracelulares de dopamina em outras estruturas tais como o córtex frontal. Estudos prévios realizados em nosso laboratório mostram que a microinjeção de antagonistas de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA no CI é capaz de reverter a catalepsia induzida pelo haloperidol. Mas ainda não se sabe se os receptores glutamatérgicos do tipo AMPA no CI também podem ser responsáveis por modular o processo de catalepsia. O presente trabalho investigou se a microinjeção de DNQX, um antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA, diretamente no colículo inferior, foi capaz de influenciar a catalepsia induzida pela administração sistêmica do neuroléptico haloperidol. Os animais foram submetidos a uma cirurgia para implantação de uma cânula no CI e receberam microinjeções de DNQX (1,0µg/0,5µl e 2,5µg/0,5µl). Em seguida foi realizada a administração sistêmica de haloperidol (1,0 mg/kg) e imediatamente após, os animais foram colocados em uma arena onde foi realizada a avaliação da catalepsia. Os resultados mostram que a microinjeção de DNQX, um antagonista de receptores AMPA diretamente no colículo inferior na dose de 1,0µg/0,5µl, pode reverter a catalepsia induzida pelo haloperidol.

Palavras-Chave: Doença de parkinson; Catalepsia; Colículo Inferior; Receptores Glutamatérgicos AMPA.

ABSTRACT

The inferior colliculus (IC) is a mesencephalic structure primarily involved in the processing of auditory information, but it also integrates sensory information of aversive nature. The electrical or chemical stimulation of this structure induces typical responses of fear, such as alert, freezing and fleeing, elicited by environmental threats. Scientific evidence suggests that the neural substrate responsible for the defensive behaviour in the inferior colliculus can also be regulated by excitatory amino acids when the microinjection of N-methyl-D-aspartate (NMDA) in this structure induces defensive behaviour such as running, standing up and jumps. However, the microinjection of AP7, a competitive antagonist of NMDA receptors, hinders the expression of these behaviours. It has been shown that the stimulation of the neural substrate of fear in the IC causes a significant increase in the extracellular levels of dopamine in other structures such as the frontal cortex. Previous studies carried out in our laboratory showed that the microinjection of NMDA glutamate receptor antagonists in the IC was able to reverse the catalepsy induced by haloperidol. But it is still unknown whether the AMPA glutamate receptors in the IC could also be responsible for modulating the catalepsy process. The present study investigated whether the microinjection of DNQX, which is an AMPA glutamate receptor antagonist, directly in the IC was able to influence the catalepsy induced by the systemic administration of the neuroleptic haloperidol. The animals were subjected to surgery to implant a cannula in the IC, and they received microinjections of DNQX (1.0µg/0.5µl and 2.5µg/0.5µl). Subsequently they received the systematic administration of haloperidol (1.0 mg/Kg), and were placed immediately afterward in an arena where the catalepsy evaluation was performed. The results showed that the microinjection of DNQX, an antagonist of AMPA receptors, directly in the IC in a dose of 1.0µg/0.5µl, can reverse the catalepsy induced by haloperidol.

Keywords: Parkinson's disease; Catalepsy; Inferior Colliculus; AMPA glutamate receptors.

SUMÁRIO

1- Introdução.....	10
2- Hipótese.....	14
3- Materiais e Métodos.....	15
3.1- Animais.....	15
3.2- Cirurgia.....	15
3.3- Drogas.....	15
3.4- Microinjeção das drogas.....	16
3.5- Indução e medida a catalepsia.....	16
3.6- Estudo do efeito da microinjeção de antagonista de receptores AMPA sobre a catalepsia induzida pelo haloperidol.....	16
3.7- Distribuição dos Grupos.....	17
3.8- Perfusão e Histologia.....	17
3.9- Análises Estatística.....	18
4- Resultados.....	19
5- Discussão.....	21
6- Conclusão.....	23
7- Referências.....	24
8- Anexo - Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP.....	30

1- INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa, que está associada a morte de neurônios na região da substância negra no mesencéfalo, esses neurônios são responsáveis pela produção de um neurotransmissor chamado dopamina (SOTGIU e RUSCONI, 2013). A dopamina exerce um papel fundamental nas funções encefálicas e está associada ao comportamento e cognição, movimento voluntário, motivação e recompensa, inibição da produção de prolactina (envolvido na lactação), sono, humor, atenção e aprendizagem (PASSAMONTI et al., 2013).

A Doença de Parkinson é um distúrbio progressivo do movimento, descrita inicialmente por James Parkinson, em 1817 que na época denominou-a “paralisia agitante” (GERLACH e RIEDERER, 1996). A Doença de Parkinson é caracterizada pela presença de quatro sinais cardinais da doença, quais sejam tremor, lentidão do movimento (bradicinesia), rigidez e dificuldades para manter o equilíbrio. A evolução da doença caracteriza-se pela piora da marcha (passos curtos), quedas frequentes, constipação, disartria, dificuldades de deglutição, sialorréia constante, incontinência urinária e finalmente anartria (WEINER, 2008). Esses sinais cardinais iniciam-se unilateralmente e à medida em que a doença progride, podem se tornar bilaterais (EBERHARDT e SCHULZ, 2003). Essas deficiências motoras são frequentemente acompanhadas por uma grande variedade de sintomas não-motorizados (por exemplo, depressão, disfunções executivas, dificuldade de concentração, distúrbios do sono, perda de peso, deficiências autonômicas), ambas as categorias de sintomas exerce um grande impacto sobre a qualidade de vida dos indivíduos que sofrem do mal de Parkinson (SCHARG *et al.*, 2000; MARTINEZ-MARTIN *et al.*, 2011).

O papel fundamental das drogas dopaminérgicas na modulação das funções cognitivas de pacientes com Doença de Parkinson, tem sido consistentemente demonstrado (BROOKS, 2006; COOLS, 2006; KEHAGIA *et al.*, 2010). O tratamento farmacológico com a dopamina (por exemplo, a L-Dopa) demonstrou melhorar a memória de trabalho, um processo cognitivo dependente do córtex pré-frontal e dos circuitos do núcleo estriado (LEWIS *et al.*, 2005; COOLS, 2006).

Os estudos envolvendo drogas que estão associadas as vias dopaminérgicas e a outras vias que participam e modulam o processo de adoecimento da Doença de Parkinson, são em sua maioria, realizados com animais. Uma das formas de estudo associada aos sintomas do mal de Parkinson é através da catalepsia. A catalepsia é definida como uma dificuldade para a correção de uma postura externamente imposta, ou seja, um animal normal que é colocado em uma postura não usual, dentro de segundos, esse animal não permanece na mesma posição que foi colocado. Por outro lado, um animal apresentando catalepsia, manterá essa postura por um longo período de

tempo. Esse tempo é considerado como um índice de catalepsia. O teste de catalepsia é usado para avaliar os efeitos motores de determinadas drogas no sistema nervoso central e é considerado um modelo animal para o estudo de distúrbios motores observados em pacientes Parkinsonianos. Algumas drogas são conhecidas por induzirem rigidez muscular e ausência de atividade espontânea (acinesia), o que caracteriza um estado de catalepsia atribuído à influência modulatória dessas drogas na via dopaminérgica nigroestriatal (HORNYKIEWICZ, 1973; SANBERG *et al.*, 1988).

De acordo com alguns estudos os testes de catalepsia mostraram que inibidores da sintase do óxido nítrico (NOS), e também o haloperidol, um neuroléptico antagonista de receptores dopaminérgicos do tipo D2, podem induzir déficits motores em roedores (DEL BEL e GUIMARÃES, 2000; MELO *et al.*, 2010; DEL BEL *et al.*, 2004). Drogas que provocam a diminuição da neurotransmissão dopaminérgica no estriado, como os neurolépticos (por exemplo, haloperidol), podem induzem a catalepsia em roedores e geram os sintomas da Doença de Parkinson, simulando o acontece em humanos (KOFFER *et al.*, 1978; SANBERG *et al.*, 1988).

Entretanto, a Doença de Parkinson tem sido reconhecida como uma neuropatologia obscura, que envolve outras regiões encefálicas além do sistema dopaminérgico nigroestriatal, incluindo aquelas que não estão diretamente envolvidas no controle motor, como, o locus coruleus, o núcleo dorsal do vago, o núcleo da rafe, o hipotálamo, o tubérculo olfatório e grande parte do córtex límbico e neocortex (FORNO, 1982; BRAAK, *et al.*, 2003). Além disso, outra estrutura localizada na parte dorsal do mesencéfalo chamada colículo inferior vem sendo estudado, e parece desempenhar um papel importante na modulação da catalepsia (MELO *et al.*, 2010). Várias linhas de evidências indicam que mecanismos patogênicos envolvidos com doenças neurodegenerativas, como a Doença de Parkinson, estão associados com excitotoxicidade, dano no DNA e modificações protéicas (ZHANG, *et al.*, 2006).

O colículo inferior (CI) é uma estrutura bilateral localizada na região dorsal do mesencéfalo e ocupa uma posição importante nas vias auditivas primárias, integrando informações de outros núcleos auditivos do tronco encefálico e enviando informações para o tálamo auditivo e núcleos que exercem a função de interface sensório-motora. Com base na morfologia celular, no padrão de projeções e nas propriedades fisiológicas dos seus neurônios, o CI pode ser dividido em três núcleos: o núcleo central, um córtex dorsal e um córtex externo (SALDAÑA e MERCHÁN, 1992).

Evidências mostram que o CI faz parte do sistema cerebral aversivo junto com a material cinzenta periaquedutal dorsal (MCPd), o hipotálamo medial (HM) e a amígdala (BRANDÃO *et al.*, 1999, 2005). Estudos comportamentais têm mostrado que a estimulação elétrica ou química do CI induz comportamentos de defesa como alerta, congelamento, fuga, reações autonômicas e analgesia (BRANDÃO *et al.*, 2005; MOREIRA *et al.*, 2003).

No CI, são encontrados receptores AMPA e NMDA, sugerindo que a neurotransmissão excitatória nessa área é glutamatérgica (KELLY e CASPARY, 2005). Microinjeções de NMDA, agonista de receptores glutamatérgicos, diretamente no colículo inferior produz ativação comportamental intercalada com congelamento muito semelhante à reação de defesa eliciada pela estimulação elétrica dessa estrutura (BRANDÃO *et al.*, 1988, 1993, 1999; CARDOSO *et al.*, 1994). Além disso, estímulos aversivos condicionados ou microinjeções de glutamato no CI induzem o comportamento de congelamento com aumento simultâneo da magnitude de potencial evocado auditivo, indicando que mecanismos mediados por aminoácidos excitatórios (AAE) estão envolvidos com o processamento sensorio-motor ativado por estímulos emocionais a nível mesencefálico (BRANDÃO *et al.*, 2001).

Tem sido demonstrado que a reação de defesa induzida por AAE microinjetados no teto mesencefálico é mediada por receptores AMPA/kainato e receptores NMDA e reguladas por mecanismos GABAérgicos no CI (CARDOSO *et al.*, 1994; NOBRE *et al.*, 2002; PANDÓSSIO e BRANDÃO *et al.*, 1999). Esse controle inibitório pode ser exercido por projeções GABAérgicas da substância negra parte reticulada para a MCPd (COIMBRA e BRANDÃO, 1993, KILPATRICK *et al.*, 1982, MAISONNETTE *et al.*, 2000) e o núcleo central do CI (COIMBRA *et al.*, 1998). Realmente, lesões da substância negra parte reticulada induzidas por injeções locais de doses neurotóxicas de NMDA aumenta a aversividade da estimulação elétrica do colículo inferior (MAISONNETTE *et al.*, 1996). É interessante lembrar que neurônios dopaminérgicos da substância negra também projetam-se para o CI (OLAZÁBAL e MOORE, 1989; VIERK *et al.*, 1968).

Além disso a dopamina e glutamato exercem efeitos opostos sobre o comportamento motor, sendo que a dopamina exerce efeito inibitório e o glutamato excitatório (SCHMIDT, 1986; SCHMIDT *et al.*, 1992). Essas evidências indicam que a pobreza de movimentos característica de sintomas parkinsonianos, pode ser atribuída a um aumento na atividade glutamatérgica e a uma redução na atividade dopaminérgica nos núcleos da base (ALBIN *et al.*, 1989; GERFEN, 1992). Esses resultados sugerem que antagonistas de receptores glutamatérgicos podem fornecer uma abordagem farmacológica alternativa para o tratamento da Doença de Parkinson (KLOCKGETHER e TURSKI, 1989).

Essa suposição foi confirmada por meio de estudos experimentais demonstrando que uma variedade de antagonistas de receptores de glutamato apresenta atividade antiparkinsoniana em animais apresentando déficits de dopamina (KLOCKGETHER *et al.*, 1990; GREENAMYRE e O'BRIEN, 1991; GREENAMYRE, 1993; OSSOWSKA, 1994; STARR, 1995; BLANDINI *et al.*, 1996). Além disso, o bloqueio da transmissão sináptica excitatória por antagonistas dos receptores do tipo AMPA pode fornecer uma nova estratégia terapêutica para o tratamento da Doença de Parkinson (KLOCKGETHER *et al.*, 1991).

Dados recentes publicados por Melo *et al.* (2010) e colaboradores mostraram que a microinjeção de AP7 ou MK801, antagonistas de receptores NMDA, no CI é capaz de reverter a catalepsia induzida pelo haloperidol. Entretanto, ainda não se sabe se os receptores do tipo AMPA do CI também participam dessa resposta.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos da administração intracolicular de DNQX, um antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA, sobre a catalepsia induzida pelo haloperidol administrado intraperitonealmente em ratos.

2- HIPÓTESE

De acordo com Melo *et al.* (2010), microinjeções de antagonistas de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA no colículo inferior, pode reverter o estado de catalepsia provocada pela administração intraperitoneal de haloperidol. Assim, espera-se que microinjeções de antagonistas de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA no colículo inferior possam também modular o processo de catalepsia induzida pelo haloperidol, podendo reverter o estado cataléptico, destacando a importância da participação desse tipo de receptor.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Animais

Ratos Wistar machos adultos provenientes do CEDEME/UNIFESP, com 8 semanas de idade e pesando entre 200-250g no início dos experimentos, foram alojados em gaiolas de acrílico transparente sob um ciclo claro-escuro de 12:12h (as luzes eram acesas às 07:00h) e $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, tendo livre acesso à água e alimento e foram mantidos no Biotério do Departamento de Biociências - UNIFESP Baixada Santista. Os experimentos foram realizados no período entre 14:00 e 18:00h e aconteceram de acordo com as recomendações da SBNeC (Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento) e todas as medidas foram tomadas para minimizar o número de animais utilizados e o seu sofrimento. A pesquisa e os procedimentos experimentais com os animais foram aprovados pelo CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) sob o número 93892101/2013.

3.2- Cirurgia

Os animais foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina (100mg/Kg) e Cloridrato de Xilazina (200mg/Kg) em uma relação de 1:1, administrado por via intraperitoneal (i.p.) e fixados a um aparelho estereotático (David Kopf, USA). A barra de fixação dos incisivos foi colocada a 3,3 mm abaixo da linha interaural, o que permite o crânio ficar em uma posição horizontal entre bregma e lambda. Uma cânula guia de aço inoxidável (o.d. 0.6 mm, i.d. 0.4mm) foi introduzida verticalmente em direção ao CI utilizando as seguintes coordenadas tendo bregma como referência: antero-posterior = 1.2 mm; médio-lateral = 1.5 mm e dorso-ventral = 4.5 mm (PAXINOS e WATSON, 1997). A cânula guia foi fixada ao crânio por meio de aplicação de acrílico dental de secagem rápida (Acrílico Auto-Polimerizante Clássico, JET, SP, Brasil e Líquido Acrílico Auto-Polimerizante Dental VIPI Ltda, SP, Brasil) e dois parafusos de aço inoxidável. Um mandril foi colocado dentro da cânula guia para evitar obstrução. Ao final da cirurgia os animais receberam uma injeção de penicilina G benzatina (Pentabiótico, Cristálalia) por via intramuscular (120.000U.I.). Todos os animais passaram por um período de recuperação de 7 dias e tiveram livre acesso à água e alimento.

3.3- Drogas

Foi utilizado o haloperidol (Haldol - Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium) utilizado comercialmente para administração intravenosa que foi diluído em salina fisiológica para obter a concentração desejada de 1mg/1ml. Para as microinjeções intracerebrais foi utilizado um volume de 0,5µl, enquanto que para as injeções sistêmicas foi administrado um volume de 1 ml/kg. Os animais controle receberam um volume equivalente de água destilada. Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes do uso. DNQX (Sigma, USA) foi dissolvido em Dimetilsufóxido (DMSO, 2.5%) imediatamente antes do uso e foi administrado nas doses de 1,0µg/0,5µl e 2,5µg/0,5µl. Salina fisiológica foi utilizada como controle para as microinjeções.

3.4- Microinjeção das drogas

Após o período de 1 semana de recuperação da cirurgia, os animais foram colocados em uma caixa acrílica e o fio de aço que protege o interior da cânula guia foi removido. Uma agulha dental 26G conectada a uma seringa Hamilton de 10µl por meio de uma cânula de polietileno (P10) foi utilizada para a microinjeção das drogas ou veículo. Através dessa agulha, que foi conectada à cânula guia previamente fixada no animal, foi realizada a microinjeção de 0,5µl da solução a uma velocidade controlada de 1 minuto, utilizando-se uma bomba de microinjeção. Após o término da microinjeção a agulha permaneceu no local por mais 1 minuto, permitindo assim uma melhor distribuição das drogas no tecido nervoso (BRANDÃO *et al.*, 1988).

3.5- Indução e medida da catalepsia

Os experimentos foram realizados em uma sala silenciosa para evitar que qualquer som ou barulho interrompa o momento cataléptico dos animais. A catalepsia foi induzida injetando-se haloperidol (1 mg/kg i.p.) 10 min antes dos animais serem colocados individualmente em uma caixa de observação construída em acrílico transparente (50 x 50 x 40 cm de altura). A medida de catalepsia foi realizada colocando-se o animal cuidadosamente com as patas anteriores apoiadas em uma barra de madeira horizontal posicionada 8 cm acima do assoalho (MORELLI e DI CHIARA, 1985). O tempo de permanência foi medido até no máximo 600s. O experimento foi dividido em 3 blocos de 10 minutos (10-20, 30-40 e 50-60 min). Em cada bloco foram realizadas no máximo três tentativas de posicionamento do animal sobre a barra. A catalepsia foi determinada pela soma do tempo, nas três tentativas, em que os animais permaneceram em posição anormal em cada bloco.

3.6- Estudo do efeito da microinjeção de antagonista de receptores AMPA sobre a catalepsia induzida pelo haloperidol.

Para investigar um possível efeito anti-cataléptico do antagonista de receptores AMPA os animais receberam uma microinjeção de DNQX (1,0 ou 2,5 µg/0,5µl) diretamente no CI 10 minutos antes da administração sistêmica de haloperidol. Os animais do grupo controle receberam um volume equivalente de salina fisiológica. As medidas de catalepsia foram iniciadas 10 minutos após a injeção de haloperidol como descrito acima (BRANDÃO *et al.*, 1988).

3.7- Distribuição dos Grupos

Os animais foram distribuídos em quatro grupos. Um grupo de 7 (sete) animais foi submetido a microinjeção intracolicular de Salina fisiológica 10 minutos antes da administração de Salina fisiológica (placebo) intraperitoneal. Outro grupo de 14 animais foi submetido a microinjeção intracolicular de Salina fisiológica 10 minutos antes da administração intraperitoneal de Haloperidol (1,0 mg/kg i.p.). Outros dois grupos foram submetidos a microinjeção intracolicular de DNQX (1,0 ou 2,5 µg/0,5µl; n = 17 e 9 (nove) animais respectivamente) 10 minutos antes da administração intraperitoneal de Haloperidol (1,0 mg/kg i.p.) Os grupos foram comparados entre eles nos tempos 10 – 20 minutos, 30 – 40 minutos, 50 – 60 minutos.

Grupos	Administração IP	Microinjeção CI
G1	Salina Fisiológica	Salina fisiológica
G2	Haloperidol 1,0 mg/kg	Salina fisiológica
G3	Haloperidol 1,0 mg/kg	DNQX 2,5µg/0,5µl
G4	Haloperidol 1,0 mg/kg	DNQX 1,0µg/0,5µl

3.8- Eutanásia (Perfusão) e histologia

Ao final do procedimento comportamental os animais foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca com solução de salina fisiológica (NaCl 0,9%) para remoção do sangue presente no encéfalo, e em seguida com solução tamponada de paraformaldeído a 4%, para fixação do tecido nervoso. Ao final desse procedimento, os encéfalos dos animais foram removidos e mantidos por no mínimo 4h na solução de paraformaldeído para pós-fixação. Em seguida, os encéfalos foram transferidos para uma solução crioprotetora de sacarose a 30% e mantidos em uma temperatura média de 4° C por um período de 48 horas. Após essa etapa, os encéfalos foram removidos, seccionados em cortes coronais, para separação do tecido mesencefálico de restante do

tecido nervoso. O bloco assim obtido foi levado ao micrótomo, onde secções seriadas de 20µm foram realizadas e adequadamente montadas em lâminas gelatinizadas. Em seguida, foram analisadas ao microscópio de luz, e os sítios de microinjeção de droga assinalados em diagramas do Atlas de Paxinos e Watson (1997).

3.9- Análise Estatística

Para análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism 5 version 5.04 (Trial). Todos os dados foram expressos em médias \pm erro padrão. Foi utilizado o Kruskal-Wallis *test* não paramétrico para comparação entre os grupos, e um pós-teste individualizados de Dunn's all compare columns, levando em consideração ($p \leq 0,05$). Os grupos foram comparados nos tempos (10 – 20, 30 – 40 e 50 - 60 minutos, após administração do haloperidol).

4- RESULTADOS

A indentificação histológica no núcleo central e córtex do CI dos sítios de microinjeção do DNQX está inslustrado pela figura 1. Nota-se que nem todos os sítios de microinjeção estão representados devido à sobreposição dos mesmos localizados no núcleo central e córtex do CI.

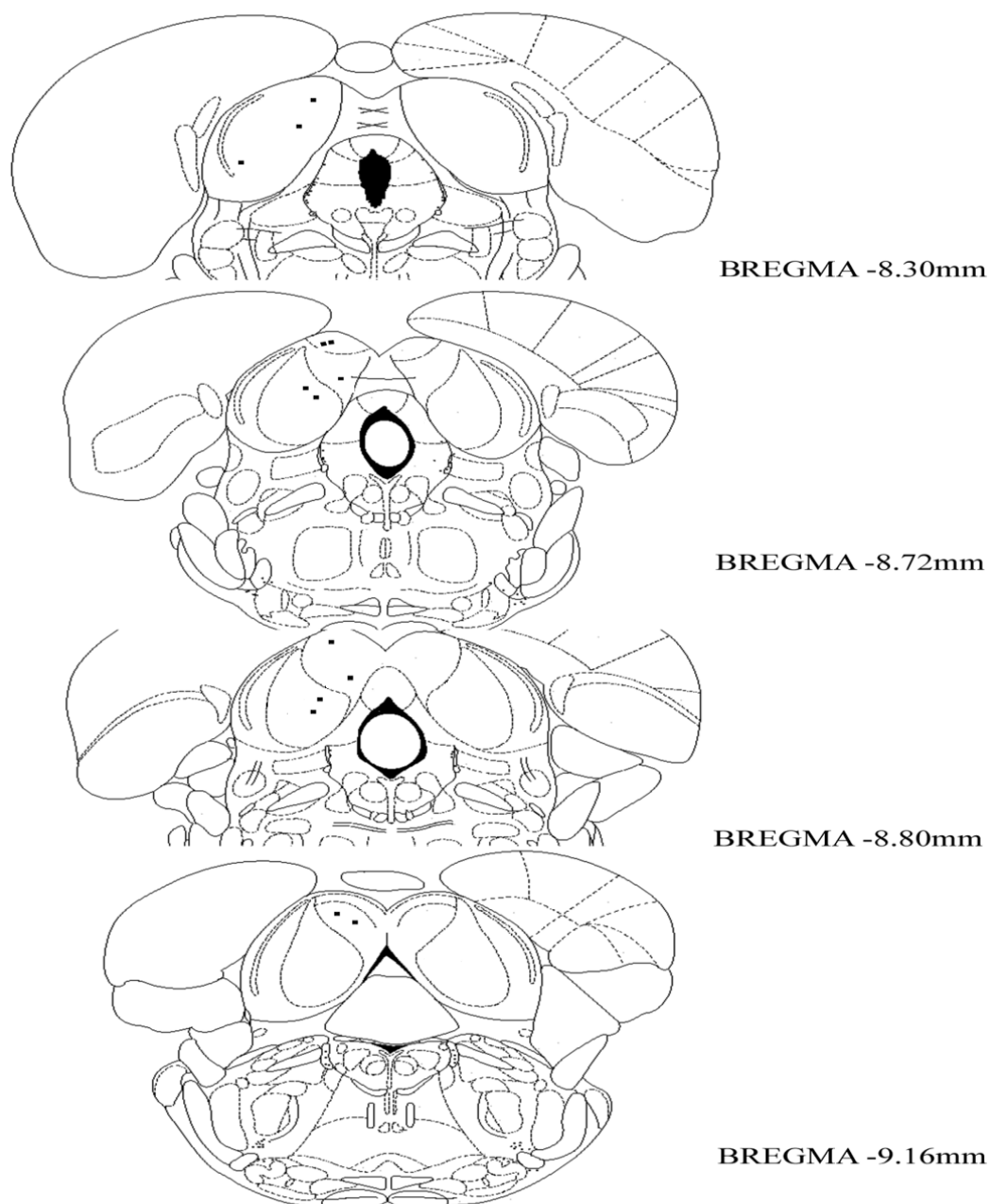


Figura 1: Representação da localização das cânulas (círculos pretos) no CI em cortes transversais, seguindo o Atlas de Paxinos e Watson (1997).

O efeito da microinjeção de DNQX diretamente no CI de ratos sobre o tempo de catalepsia nos intervalos 10 – 20, 30 – 40 e 50 – 60 minutos após a injeção intraperitoneal de haloperidol (1mg/kg), pode ser observado através da figura 2. Apenas no intervalo 10-20 minutos

houve uma diferença no tempo de catalepsia entre os grupos Haloperidol/salina e Haloperidol/DNQX 1,0µg/0,5µl ($H = 77.33$; $p < 0.0001$); Nos demais intervalos (30 – 40 e 50 – 60 min) não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$). A microinjeção de DNQX (1,0µg/0,5µl) reduziu o tempo de catalepsia apenas no intervalo 10-20 min.

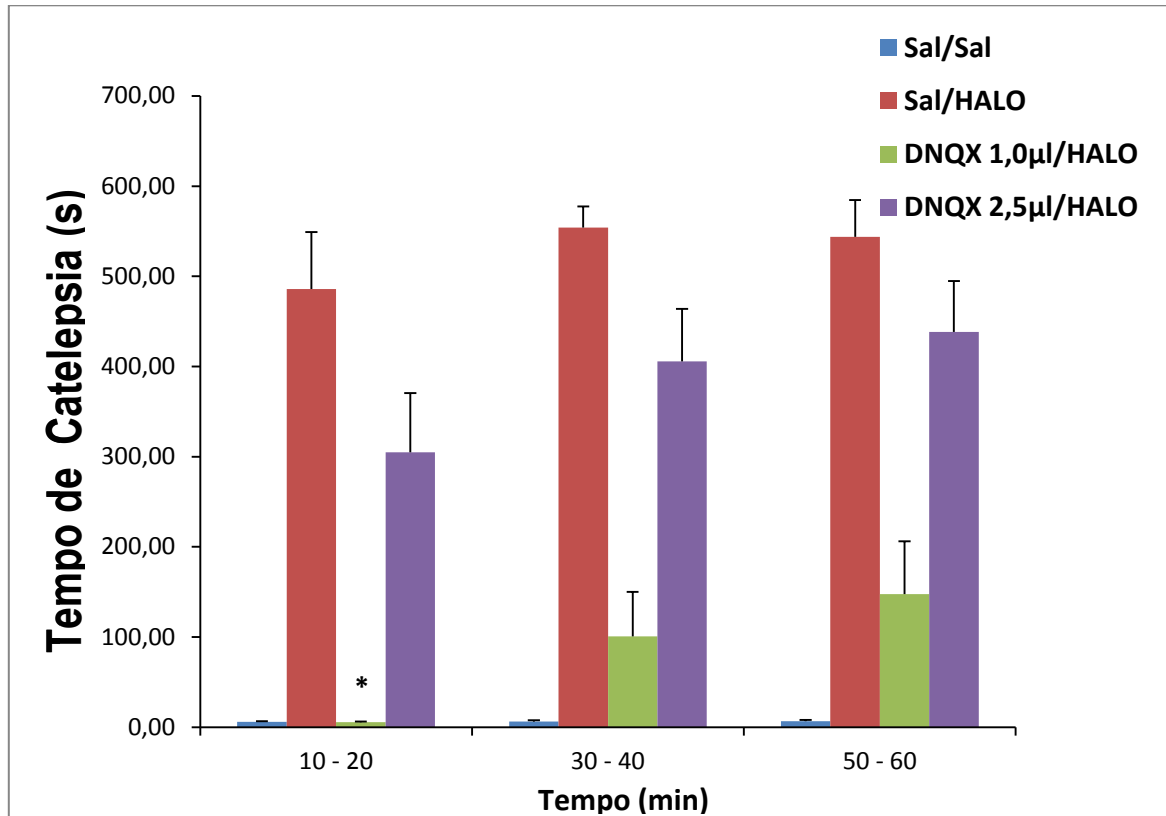


Figura 2: Efeitos da microinjeção intracolicular de DNQX sob a catalepsia induzida pelo haloperidol intraperitoneal.

* indica diferença significativa em entre o grupo Sal/Halo e DNQX 1,0 µg/HALO ($p \leq 0,05$).

5- DISCUSSÃO

No presente trabalho foi demonstrado que a administração sistêmica de haloperidol produziu uma catalepsia significativa, replicando dados da literatura (RIEDINGER *et al.*, 2011; GHOSH *et al.*, 2011). Os resultados do presente estudo mostram que essa catalepsia pode ser atenuada pela microinjeção de DNQX, um antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA, diretamente no CI. Outros autores já demonstraram que a microinjeção de outro antagonista, o BNQX em regiões encefálicas como o núcleo subtalâmico, o globo pálido e substância negra parte reticulada, promove aumento da atividade motora e reduz a rigidez muscular, porém não exerce efeito sobre a cinesia (KLOCKGETHER *et al.*, 1991).

Segundo Olazábal e Moore (1989), existem conexões anatômicas entre o CI e a substância negra, e outras estruturas que fazem parte do circuito motor. Alguns estudos que investigam a relação entre catalepsia e receptores NMDA mostram que antagonistas de receptores NMDA podem reverter a catalepsia induzida pelo haloperidol (KAUR *et al.*, 1997; MEHTA e TICKU, 1990; MOORE *et al.*, 1993; PAPA *et al.*, 1993; SCHMIDT e BUBSER, 1989; VERMA e KULKARNI, 1992).

Segundo Melo *et al.* (2010), a microinjeção de AP7 ou MK801, antagonistas de receptores NMDA, no CI é capaz de reverter a catalepsia induzida pela administração sistêmica de haloperidol. Porém, outros autores mostram que a administração antagonistas de receptores não NMDA, como, CNQX, BNQX e GYKI 52466, não foram capazes de reverter a catalepsia induzida pelo haloperidol (MAJ *et al.*, 1995; PAPA *et al.*, 1993; ZADOW e SCHMIDT, 1994), o que não corrobora com os dados que foram encontrados no presente trabalho.

Um estudo realizado por Elazar e Berchanski (2001), analisou os efeitos dos aminoácidos excitatórios (AAE) na formação reticular pontina (FRP) e a relação com a catalepsia. Esse estudo mostra os efeitos dos antagonistas de receptores do tipo AMPA ou NMDA sobre a interação entre os AAE e o Carbacol na catalepsia. A microinjeção na formação reticular pontina (FRP) de antagonistas de receptores AMPA e NMDA, respectivamente DNQX e MK 801, diminuíram fortemente os efeitos da catalepsia induzida pelo carbacol associado ao glutamato, evidenciando a importância do substrato neural glutamatérgico.

Outro estudo realizado por Riedinger *et al.* (2010), que testou o papel dos receptores do tipo NMDA e AMPA/Kainato, administrou intraperitonealmente haloperidol induzindo catalepsia, que pode ser atenuada por ambos os receptores antagonistas do tipo NMDA e AMPA que também foram administrados intraperitonealmente. Além disso, mostrou que a dosagem mais alta de MK-801 teve um papel mais forte sobre os efeitos da catalepsia, sugerindo que seja um mecanismo dose

dependente. Esses achados corroboram com os resultados do presente trabalho, sugerindo que os antagonistas de receptores do tipo AMPA parecem reverter a catalepsia induzida pelo haloperidol (i.p.) (ELAZARI e BERCHANSKI, 2001; RIEDINGER *et al.*, 2011).

É importante ressaltar que ambos os receptores de antagonista do tipo AMPA e NMDA podem ter um papel fundamental na diminuição do efeito da catalepsia induzida pelo haloperidol. Esses resultados, bem como os do presente estudo, parecem estar em divergência com outros estudos que mostraram que apenas os antagonistas de receptores NMDA foram capazes de reverter a catalepsia induzida pelo haloperidol (MAJ *et al.*, 1995; PAPA *et al.*, 1993; ZADOW e SCHMIDT, 1994). É possível que essas divergências sejam atribuídas a doses e vias de administração diferentes ou diferentes testes de catalepsia usados por esses autores.

Nessa mesma perspectiva Rukoiatkina e colaboradores (2000), utilizaram o haloperidol para provocar a imobilidade nos animais e junto à isso, testaram algumas drogas como, IEM-1925 e IEM-1754, que são respectivamente antagonista glutamatérgicos de receptores do tipo AMPA e NMDA. Os resultados desse trabalho mostraram que o bloqueio dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA tem ação anti-cataléptica, já o bloqueio dos receptores do tipo AMPA podem influenciar negativamente na catalepsia, de modo que não favorece a ação anti-cataléptica.

Contudo, um estudo que utilizou altas doses de morfina (20, 40, 60 mg/kg i.p.) para provocar a catalepsia nos animais, com objetivo de examinar o papel dos receptores glutamatérgicos, mostrou que existem divergências relacionadas ao tipo de droga utilizada, tipo de receptor analisado, dose dependente e mecanismos de análises da catalepsia. Nesse estudo Tzschentke e Schmidt (1996), utilizaram CGP 37849 (2 e 6 mg/kg, i.p.) um antagonista competitivo de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e o GYKI 52466 (2 e 4 mg/kg, i.p.), um antagonista não-competitivo de receptores glutamatérgicos do Tipo AMPA. O grau de catalepsia foi avaliado utilizando dois métodos diferentes, o bar podium (o mais comum utilizado para medir catalepsia induzida por neurolépticos) e o teste de ausência ou presença de reflexos com endireitamento do animal em decúbito dorsal.

Os resultados utilizando o antagonista do receptor do tipo AMPA mostrou que a dose mais baixa de GYKI 52466 (2 mg/kg) pareceu atenuar o efeito da catalepsia provocada pela morfina, enquanto que a dose mais elevada (4 mg/kg) aumentou a catalepsia induzida pela morfina em alguns casos, o que de certo modo, sugere que as doses mais altas podem ter respostas diferentes das doses mais baixas, corroborando com os achados no presente trabalho, no qual o DNQX na dose 1,0µg/0,5µl reverteu a catalepsia provocada pelo haloperidol, embora as doses mais altas não tenham apresentando o mesmo resultado.

6- CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados do presente estudo sugerem que a microinjeção de antagonistas de receptores glutamatérgico do tipo AMPA no CI pode reverter a catalepsia induzida pela administração sistêmica de haloperidol, evidenciando a importância desses receptores. No entanto, é necessário que se faça mais investigações utilizando outras doses e outros tipos de antagonistas de receptores AMPA, para esclarecer melhor a sua participação sobre a catalepsia induzida pelo haloperidol. Outras investigações abordando esses aspectos citados acima, talvez possam indicar com mais segurança se realmente os receptores do tipo AMPA podem ser responsáveis pela reversão da catalepsia induzida pelo haloperidol.

7- REFERÊNCIAS

ALBIN, R.L.; YOUNG, A.B.; PENNY, J.B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. **Trends in Neurosciense**, Cambrigde, v.12, n.10, p.366-375, oct., 1989.

BLANDINI, F.; GREENAMYRE, J.T.; NAPPI, G. The role of glutamate in the pathophysiology of Parkinson's disease. **Functional Neurology**, Pavia, v.11, n.1, p.3-15, jan./feb., 1996.

BRAAK, H. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, Atlanta, v.24, n.2, p.197-211, apr., 2003.

BRANDÃO, M.L. *et al.* Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neuroscience e Biobehavioral Reviews**, Cambrigde, v.23, n.6, p.863-875, jan., 1999.

BRANDÃO, M.L. *et al.* Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. **Neuroscience e Biobehavioral Reviews**, Cambrigde, v.29, n.8, p.1299-1311, aug., 2005.

BRANDÃO, M.L.; CARDOSO, S.H.; MELO, L.L. Defense mechanisms in the inferior colliculus. **Behavioral Brain Research**, Atlanta, v.58, n.1-2, p.49-55, dec., 1993.

BRANDÃO, M.L.; COIMBRA, N.C. Defensive behavior induced by microinjections of bicuculline into the inferior colliculus. **Physiology Behavioral**, Cambrigde, v.44, n.3, p.361-365, dec., 1988.

BRANDÃO, M.L.; COIMBRA, N.C.; OSAKI, M.Y. Changes in the auditory-evoked potentials induced by fear-evoking stimulations. **Physiology Behavioral**, Cambrigde, v.72, n.3, p.365-372, feb., 2001.

BROOKIS, D.J. Dopaminergic action beyond its effects on motor function: imaging studies. **Journal of Neurology**, London, v.253, n.4, p.IV8–IV15, aug., 2006.

CARDOSO, S.H.; COIMBRA, N.C.; BRANDÃO, M.L. Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus. **Behavioral Brain Research**, Atlanta, v.63, n.1, p.17-24, jul., 1994.

COIMBRA, N.C.; BRANDÃO, M.L. GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation. **Behavioral Brain Research**, Atlanta, v.59, n.1-2, p.131-139, dec., 1993.

COIMBRA, N.C. *et al.* Nigrotectal pathway: neuroanatomy and role on defensive behavior elicited by midbrain tectum stimulation. **Society for Neuroscience**, Washington, v.24, n.1, p.11-13, dec., 1988.

COOLS, R. Dopaminergic modulation of cognitive function-implications for L-DOPA treatment in Parkinson's disease. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, Cambridge, v.30, n.1, p.1-23, jun., 2006.

DEL BEL E.A.; GUIMARÃES F.S. Sub-chronic inhibition of nitricoxide synthesis modifies haloperidol-induced catalepsy and the number of NADPH-diaphorase neurons in mice. **Psychopharmacology**, Cambridge, v.147, n.4, p.356-361, jan., 2000.

DEL BEL, E. A. *et al.* Catalepsy induced by intra-striatal administration of nitric oxide synthase inhibitors in rats. **European Journal of Pharmacology**, Cambridge, v.485, n.1-3, p.175-181, feb., 2004.

ELAZAR, Z.; BERCHANSKI, A. Glutamatergic-cholinergic synergistic interaction in the pontine reticular formation. Effects on catalepsy. Naunyn- Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, New York, v.363, n.5, p.569-76, may., 2001.

EBERHARDT, O. SCHULZ, J.B. Apoptotic mechanisms and antiapoptotic therapy in the MPTP model of Parkinson's disease. **Toxicology Letters**, Tübingen, v.139, n.2-3, p.135-151, apr., 2003.

FORNO, L.S. Pathology of Parkinson's disease. In: MARSDEN, C.D.; FAHN, S. (Eds). **Movement Disorders**. London: Butterworth Scientific, 1982. p.25-40.

GERFEN, C.R. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. **Trends in Neuroscience**, Cambridge, v.15, n.4, p.133-139, apr., 1992.

GERLACH, M.; RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. **Journal of Neural Transmission**, Würzburg, v.103, n.1-3, p.987-1041, jan., 1996.

GHOSH, A. Effect of chronic administration of low dose aspirin on haloperidol induced catalepsy in rats. **Journal Pharmacol Pharmacother**, Pondicherry, v.2, n.3, p.198-9, jul., 2011.

GREENAMYRE, J.T. Glutamate-dopamine interactions in the basal ganglia: relationship to Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, New York, v.91, n.2-3, p.255-269, jan., 1993.

GREENAMYRE, J.T.; O'BRIEN, C.F. N-Methyl-D-aspartate antagonists in the treatment of Parkinson's disease. **Archives of Neurology**, New York, v.48, n.6, p.977-981, sep., 1991.

HORNYKIEWICZ, O. Parkinson's disease: from brain homogenate to treatment. **Federation Proceedings**, Vienna, v.32, n.2, p.183-190, feb., 1973.

KAUR, S.; OZER, H.; STARR, M. MK-801 reverses haloperidol- induced catalepsy from both striatal and extrastriatal sites in the rat brain. **European Journal Pharmacology**, Cambridge, v.332, n.2, p.153-60, aug., 1997.

KEHAGIA, A.A.; BARKER, R.A.; ROBBINS, T.W. Neuropsychological and clinical heterogeneity of cognitive impairment and dementia in patients with Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, Cambridge, v.9, n.12, p.1200-1213, dec., 2010.

KELLY, J.B., CASPARY, D.M. Pharmacology of the inferior colliculus. In: WINER, J.A.; SCHREINER, C.E. (Eds). **The Inferior Colliculus**. New York: Springer, 2005. p.248-310.

KILPATRICK, I.C.; COLLINGRIDGE, G.L.; STARR, M.S. Evidence for the participation of nigroreticular gamma-aminobutyrate-containing neurons in striatal and nigral-derived circling in the rat, **Neuroscience**, Bristol, v.7, n.1, p.201-222, jan., 1982.

KLOCKGETHER, T.; TURSKI, L. Excitatory amino acids and the basal ganglia: implications for the therapy of Parkinson's disease. **Trends in Neuroscience**, Cambridge, v.12, n.1, p.285-286, jan., 1989.

KLOCKGETHER, T. *et al.* The AMPA receptor antagonist NBQX has antiparkinsonian effects in monoamine-depleted rats and MPTP-treated monkeys. **Annals of neurology**, Tübingen, v.30, n.5, p.717-723, nov., 1991.

KLOCKGETHER, T. *et al.* N-Methyl-D-aspartate antagonists stimulate locomotor activity in monoamine-depleted rats: implications for the therapy of Parkinson's disease. In: LUBEC, G.; ROSENTHAL, G.A. (Eds.), **Amino Acids: Chemistry, Biology and Medicine**. Leiden, 1992. p.269-275.

KOFFER, K.B.; BERNEY, S.; HORNYKIEWICZ, O. The role of the corpus striatum in neuroleptic- and narcotic-induced catalepsy. **European Journal Pharmacology**, Cambridge, v.47, n.1, p.81-86, jan., 1978.

LEWIS, S.J. *et al.* Dopaminergic basis for deficits in working memory but not attentional set-shifting in Parkinson's disease. **Neuropsychologia**, Cambridge, v.43, n.6, p.823-832, dec., 2005.

MAISONNETTE, S.S. *et al.* Effects of lesions of amygdaloid nuclei and substantia nigra on aversive responses induced by electrical stimulation of the inferior colliculus, **Brain Research Bulletin**, São Paulo, v.40, n.2, p.93-98, jan., 1996.

MAISONNETTE, S.S. *et al.* Microinfusion of nefazodone into the basolateral nucleus of the amygdala enhances defensive behavior induced by NMDA stimulation of the inferior colliculus. **Physiology & Behavior**, Rio de Janeiro, v.70, n.3-4, p.243-247, aug./sep., 2000.

MAJ, J. *et al.* Some behavioral effects of CNQX, NBQX and AMPA receptor. **Polish Journal of Pharmacology**, v.47, n.4, p.269-77, jul., 1995.

MARTINEZ-MARTIN, P. The impact of non-motor symptoms on health-related quality of life of patients with Parkinson's disease. **Movement Disorders**, Madrid, v.26, n.3, p.399-406, feb., 2011.

MELO, *et al.* Glutamatergic neurotransmission mediated by NMDA receptors in the inferior colliculus can modulate haloperidol-induced catalepsy. **Brain Research**, Bragança Paulista, v.19, n.1349, p.41-47, aug., 2010.

MEHTA, A.K.; TICKU, M.K. Role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in experimental catalepsy in rats. **Life Science**, Cambridge, v.46, n.5, p.37-42, jan., 1990.

MOORE, N.A. *et al.* NMDA receptor antagonists inhibit catalepsy induced by either dopamine D1 or D2 receptor antagonists. **European Journal Pharmacology**, v.237, n.1, p.1-7, jun., 1993.

MOREIRA, F.A. *et al.* Flight reactions to nitric oxide in the inferior colliculus of rats depend on NMDA receptor activation. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, Ribeirão Preto, v.76, n.1, p.35-41, aug., 2003.

MORELLI, M.; DI CHIARA, G. Catalepsy induced by SCH 23390 in rats. **European Journal Pharmacology**, Cagliari, v.117, n.2, p.179-185, nov., 1985.

NOBRE, M.J.; BORELLI, K.G.; BRANDÃO, M.L. Fast-acting excitatory amino acids are involved in the enhancement of the aversiveness of the electrical stimulation of the inferior colliculus by systemic injections of muscimol. **Life Science**, Ribeirão Preto, v.71, n.25, p.2961-2972, nov., 2002.

OLAZÁBAL, U.E.; MOORE, J.K. Nigrotectal projection to the inferior colliculus: horseradish peroxidase transport and tyrosine hydroxylase immunohistochemical studies in rats, cats and bats. **Journal of Comparative Neurology**, Stony Brook, v.282, n.1, p.98-118, apr., 1989.

OSSOWSKA, K. The role of excitatory amino acids in experimental models of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, Kraków, v.8, n.1-2, p.39-71, jun., 1994.

PANDÓSSIO, J.E.; BRANDÃO, M.L. Defensive reactions are counteracted by midazolam and muscimol and elicited by activation of glutamate receptors in the inferior colliculus of rats. **Psychopharmacology**, v.142, n.4, p.360-368, mar., 1999.

PAPA, S.M. Opposite effects of NMDA and AMPA receptor blockade on catalepsy induced by dopamine receptor antagonists. **European Journal Pharmacology**, Cambridge, v.232, n.(2-3), p.247-53, mar., 1993.

PASSAMONTI, L. *et al.* Dopamine-transporter levels drive striatal responses to apomorphine in Parkinson's disease. **Brain and Behavior**, v.3, n.3, p.249-262, nov., 2013.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 3.ed. New York: Academic Press, 1997.

RIEDINGERA, K. *et al.* The role of NMDA and AMPA/Kainate receptors in the consolidation of catalepsy sensitization. **Behavioural Brain Research**, Cambridge, v.218, n.1, p-194-9, mar., 2011.

SALDAÑA, E.; MERCHÁN, M.A. Intrinsic and commissural connections of the rat inferior colliculus. **Journal of Comparative Neurology**, Salamanca, v.319, n.3, p.417-437, may., 1992.

SANBERG, P.R. *et al.* The catalepsy test: its ups and downs. **Behavioral Neuroscience**, Ohio, v.102, n.5, p.748-759, oct., 1988.

SCHMIDT, W.J. Intrastriatal injection of DL-2-amino-5-phosphono-valeric acid (AP-5) induces sniffing stereotypy that is antagonized by haloperidol and clozapine. **Psychopharmacology**, Stuttgart, v.90, n.1, p.123-130, jun., 1986.

SCHMIDT, W.J.; BUBSER, M. Anticataleptic effects of the N- methyl-D-aspartate antagonist MK-801 in rats. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, Stuttgart, v.32, n.3, p.621-623, mar., 1989.

SCHMIDT, W.J.; BUBSER, M.; HAUBER, W. Behavioural pharmacology of glutamate in the basal ganglia. **Journal of Neural Transmission**, Tübingen, v.38, n.1, p.65-89, jun., 1992.

SCHARG, A.; JAHANSHAH, M.; QUINN, N. What contributes to quality of life in patients with Parkinson's disease?. **Journal Neurology Neurosurgery & Psychiatry**, London, v.69, n.3, p.308-312, sep., 2000.

STARR, M.S. Glutamate/dopamine D1/D2 balance in the basal ganglia and its relevance to Parkinson's disease. **Synapse**, London, v.19, n.4, p.264-293, apr., 1995.

SOTGIU, I.; RUSCONI, M.L. Investigating emotions in Parkinson's disease: what we know and what we still don't know. **Frontiers in Psychology**, Bergamo, v.4, n.336, p.1-5, jun., 2013.

TZSCHENTKE, T. M.; SCHMIDT, W. J. Morphine-induced catalepsy is augmented by NMDA receptor antagonists, but is partially attenuated by an AMPA receptor antagonist, **European Journal Pharmacology**, Cambridge, v.295, n.(2-3), p.137-46, jan., 1996.

VERMA, A.; KULKARNI, S.K. D1/D2 dopamine and N-methyl- D-aspartate (NMDA) receptor participation in experimental catalepsy in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, Cambridge, v.109, n.4, p.477-83, jan., 1992.

VIERK, C.G.; BROOKS, R.; GOODMAN, D.C. Forced movement resulting from midbrain stimulation in the rat. **Brain Evolution Research**, Gainesville, v.1, n.6, p.519-528, jan., 1986.

WEINER W. J. There Is No Parkinson Disease. **Archives of Neurology**, Baltimore, v.65, n.6, p-705-708, jun., 2008.

ZADOW, B.; SCHMIDT, W. The AMPA antagonists NBQX and GYKY 52466 do not counteract neuroleptic-induced catalepsy. **Naunyn- Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, New York, v.349, n.1, p.61-5, jan., 1994.

ZHANG, L.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Role of nitric oxide in Parkinson's disease. **Pharmacology & Therapeutics**, Bridgewater, v.109, n.1-2, p.33-41, jan., 2006.

8- ANEXO – Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



São Paulo, 07 de novembro de 2013
CEUA N 938921013

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Ronaldo Vagner Thomatieli Dos Santos

Depto/Disc: Biociências

Pesquisadores associados: Liana Lins Melo (unifesp); Luan Castro Tonelli (unifesp);

Título do projeto: "Investigação do papel dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA no colículo inferior sobre a catalepsia induzida pelo Haloperidol em ratos."

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP

O colículo inferior é uma estrutura mesencefálica primariamente envolvida no processamento da informação auditiva, mas também integra informação sensorial de natureza aversiva. A estimulação elétrica ou química dessa estrutura induz respostas típicas de medo tais como alerta, congelamento e fuga eliciadas por ameaças ambientais. Várias evidências sugerem que o substrato neural responsável pelo comportamento defensivo no colículo inferior pode também ser regulado por aminoácidos excitatórios uma vez que a microinjeção de NMDA nessa estrutura induz comportamento defensivo caracterizado por corrida, levantamentos e saltos. A microinjeção de AP7, um bloqueador competitivo de receptores NMDA impede a expressão desses comportamentos. Tem sido demonstrado que a estimulação do substrato neural do medo no colículo inferior causa um aumento significativo nos níveis extracelulares de dopamina em outras estruturas tais como o córtex frontal. Estudos prévios realizados em nosso laboratório mostram que a microinjeção de antagonistas de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA no CI é capaz de reverter a catalepsia induzida pelo haloperidol. O presente trabalho pretende investigar se a microinjeção de DNQX, um antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA, diretamente no colículo inferior, é capaz de influenciar a catalepsia induzida pela administração sistêmica do neuroléptico haloperidol. Os animais serão submetidos a uma cirurgia para implantação de uma cânula no CI e receberão microinjeções de AMPA (2,5 ou 5?g/0,5?l) e em seguida será realizada a administração sistêmica de haloperidol (1 mg/kg). Imediatamente após serão colocados em uma arena onde será realizada a avaliação da catalepsia.

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 07/11/2013, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo